

**Einfluß von Allopurinol, Oxipurinol
bzw. deren Ribosiden und Ribotiden sowie von
Benzbromaron auf die Purin- und Pyrimidinsynthese
von Fibroblasten- und Neurospora crassa-Kulturen**

Hans-Jürgen Edmüller

1975

Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München

Direktor Prof. Dr. N. Zöllner

Einfluß von Allopurinol, Oxipurinol bzw. deren Ribosiden

und Ribotiden sowie von Benzbromaron auf die Purin- und

Pyrimidinsynthese von Fibroblasten- und Neurospora crassa-

Kulturen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Jürgen Edmüller

aus

Weilheim

München 1975

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. N. Zöllner

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Kaiser

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 1975



Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	Abkürzungen	3
2.	Einleitung	4
2.1	Wirkung von Allopurinol auf die Purin- und Harnsäurebiosynthese	4
2.2	Wirkung von Allopurinol auf die Pyrimi- dinbiosynthese	8
2.3	Wirkung von Benzbromaron auf die Purin- und Pyrimidinbiosynthese	9
3.	Materialien und Methoden	9
3.1	Untersuchung der Purinbiosynthese an Neurospora crassa-Kulturen	9
3.2	Untersuchung der Pyrimidinbiosynthese an Neurospora crassa-Kulturen	12
3.3	Untersuchung der Purinbiosynthese an Fibroblastenkulturen	13
3.4	Untersuchung der Pyrimidinbiosynthese an Fibroblastenkulturen	15
3.5	Untersuchte Substanzen	17
4.	Ergebnisse	
4.1	Purinbiosynthese der Neurospora crassa-Kulturen	19
4.2	Pyrimidinbiosynthese der Neurospora crassa-Kulturen	23

4.3	Purin- und Pyrimidinbiosynthese von Neurospora crassa-Kulturen unter Ein- fluß von Benzbromaron	27
4.4	Purinbiosynthese der Fibroblasten	29
4.5	Pyrimidinbiosynthese der Fibroblasten	33
4.6	Purin- und Pyrimidinbiosynthese von Fibroblasten unter dem Einfluß von Benzbromaron	37
5.	Diskussion	38
5.1	Purinbiosynthese unter Einwirkung von Allopurinol und dessen Metaboliten	38
5.2	Pyrimidinbiosynthese unter Einwirkung von Allopurinol und dessen Metaboliten	44
5.3	Pyrimidin- und Purinbiosynthese unter Einwirkung von Benzbromaron	46
6.	Zusammenfassung	47
7.	Literaturverzeichnis	49
8.	Lebenslauf	52

1. Abkürzungen

A	Allopurinol
AS	Allopurinol-1-N-Ribonucleosid
AT	Allopurinol-1-N-Ribonucleotid
FGAR	Formylglycinamidribonucleotid
HG-PRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IMP	Inosinmonophosphat
ODC	Orotidyl-Decarboxylase
OMP	Orotidinmonophosphat
O-PRT	Orotidyl-Phosphoribosyl-Transferase
O	Oxipurinol
OS	Oxipurinol-7-N-Ribonucleosid
OT	Oxipurinol-7-N-Ribonucleotid
PRPP	Phosphoribosyl-Pyrophosphat
UMP	Uridinmonophosphat

2. Einleitung

2.1 Wirkung von Allopurinol auf die Purin- und Harnsäurebiosynthese

Allopurinol, ein Analoges von Hypoxanthin, stellt sowohl einen kompetitiven Inhibitor als auch ein Substrat dar für das letzte Enzym der Harnsäuresynthese, die Xanthinoxidase. Dieser Umstand erklärt auch seine Anwendung als wirkungsvolles, zudem nebenwirkungsfreies, hypourikämisches Medikament beim Menschen. Während der Verabreichung von Allopurinol bewirkt die partielle Hemmung der Xanthinoxidase eine Senkung der Serumharnsäurekonzentration und eine Herabsetzung der Harnsäureausscheidung.

Eine Bilanzierung weist die Oxipurinausscheidung jedoch im Verhältnis zur entsprechenden Senkung der Harnsäureausscheidung als geringer aus. Neben der Hemmung der Xanthinoxidase wird ein weiterer Mechanismus in Gang gebracht, der mit einer Hemmung der de novo Purinsynthese durch Allopurinol oder eines seiner Metaboliten erklärt wird (8, 23).

Die Purinanalogen bzw. Purinderivate imitieren bei der Purinbiosynthese die normalerweise wirkende Endprodukthemmung der natürlichen Purine. Ihre Wirkungsweise erklärt sich entweder durch:

1. Feedback-Hemmung an einem der ersten Schritte der Purinbiosynthese

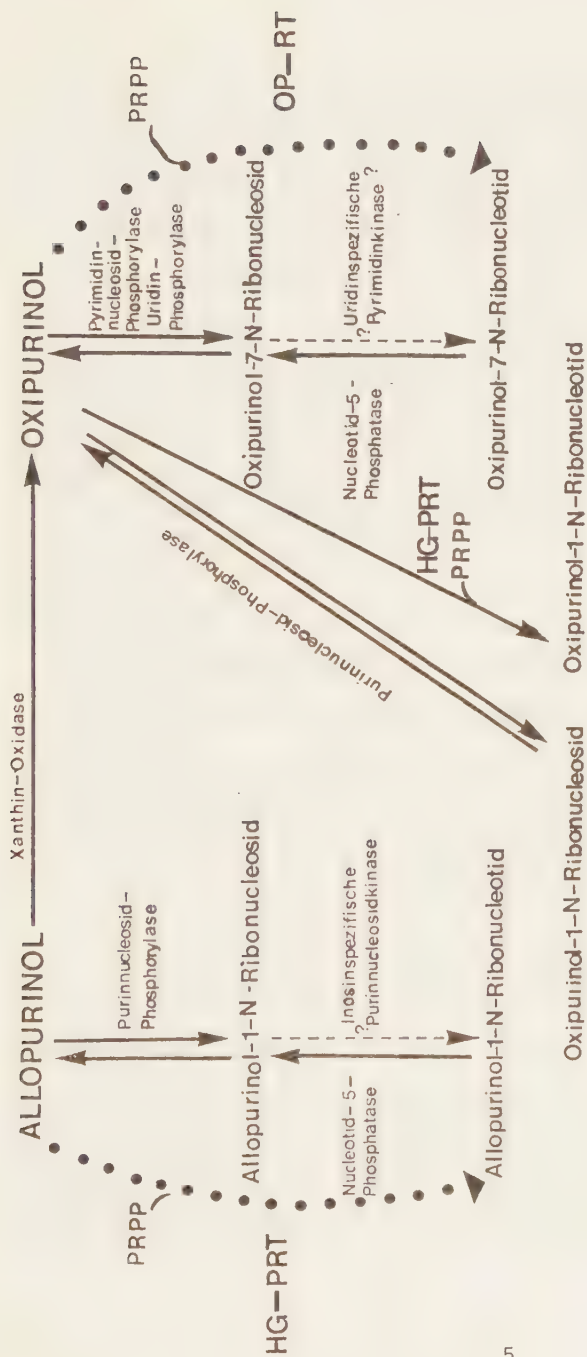


Abb. 1

Metabolismus von Allopurinol und Oxipurinol
(nach 13)

oder

2. Schaffung eines Substratmangels an PRPP für die Purinbiosynthese, indem sie dieses Substrat für ihre eigene Umwandlung zu Nucleotiden verbrauchen.

Die biologisch aktive Wirkung der Purinanalogen entsteht, gemäß der Wirkungsweise natürlicher Purinbasen, erst nach Umwandlung in die entsprechenden Riboside bzw. deren Ribotide. Somit können exogene Gaben von Purinanalogen, die als freie Basen verabreicht werden, erst nach Umwandlung zur pharmakologisch aktiven Form ihre Wirkungsweise entfalten.

Für die Wirkungsweise von Allopurinol auf die Purinbiosynthese bestehen verschiedene Vorstellungen. Die Aufklärung des genauen Mechanismus kompliziert der Metabolismus von Allopurinol selbst (Abb. 1). So wandelt in vivo die Xanthinoxidase verabreichtes Allopurinol zum entsprechenden Xanthinanalogue Oxipurinol um (Oxoallopurinol, Alloxanthin) (13).

Eine weitere Metabolisierung von Allopurinol führt über die Purinnucleosidphosphorylase zu Allopurinol-1-N Ribonucleosid (18) und durch die HG-PRT-ase zu Allopurinol-1-N-Ribonucleotid. In vivo scheidet die Niere weitaus den größten Teil des durch die Xanthinoxidase aus Allopurinol entstandenen Oxipurinols aus. Die Pyrimidinnucleosidphosphorylase wandelt jedoch einen Teil des Oxipurinols zu

Oxipurinol-7-N-Ribonucleosid und die Purinnucleosidphosphorylase auch zu Oxipurinol-1-N-Ribonucleosid um (8).

Die O-PRT kann aus Oxipurinol direkt Oxipurinol-7-N-Ribonucleosid bilden. Oxipurinol-1-N-Ribonucleotid entsteht vermutlich direkt durch die HG-PRT (3).

Welcher oder welche dieser Stoffwechselmetabolite von Allopurinol nun eine Hemmwirkung auf die Purinbiosynthese ausüben und in welcher Weise dies geschieht, ist weder durch in vivo noch in vitro Untersuchungen geklärt. Für die Wirkung von Allopurinol auf den Purin- und Harnsäurestoffwechsel sind prinzipiell zwei verschiedene Mechanismen zu diskutieren.

- a) Wirkung durch Hemmung der Xanthinoxidase
- b) Hemmung auf die de novo Purinbiosynthese.

Indem sie die Xanthinoxidase pseudoirreversibel inaktivieren, hemmen sowohl Allopurinol als auch Oxipurinol in vivo (22) und in vitro (9) die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin sowie weiter von Xanthin zu Harnsäure. Der Vergleich beider Substanzen in vitro erweist Allopurinol im Vergleich zu Oxipurinol als wirksameren Inhibitor der Xanthinoxidase (7) .

Zur Erklärung der beobachteten Hemmwirkung von Allopurinol auf die de novo Purinbiosynthese bieten sich verschiedene Mechanismen zur Diskussion an.

- a. Feedback-Hemmung auf die PRPP-Amidotransferase durch die während der Hemmung der Xanthinoxidase akkumulierten Ribonucleotide (IMP, AMP, GMP), die über den Reutilisations- bzw. im Interkonversionsstoffwechsel entstehen.
- b. Pseudo-Feedback-Hemmung durch Allopurinol- bzw. Oxipurinolribonucleotide. Wie bereits kurz skizziert, kommt es zur Bildung von Oxipurinol- bzw. Allopurinolribonucleotiden, die eventuell direkt eine Hemmwirkung auf die PRPP-Amidotransferase ausüben können.
- c. Substratverarmung von PRPP für die de novo Purinbiosynthese. Der vermehrte Verbrauch von PRPP im Reutilisationsstoffwechsel, die Umwandlung akkumulierten Hypoxanthins zu IMP und der Verbrauch von PRPP zur Synthese von Allopurinol- bzw. Oxipurinolribonucleotiden führt in der Zelle einen PRPP-Mangel herbei, der die Purinsynthesegeschwindigkeit vermindern kann.

2.2 Wirkung von Allopurinol auf die Pyrimidinbiosynthese.

Im Rahmen der Therapie von Gichtpatienten mit Allopurinol beobachteten verschiedene Autoren (1, 10, 15) eine Erhöhung der renalen Orotsäure- bzw. Orotidinausscheidung auf das Sieben- bis Zehnfache. Diese renale Erhöhung der beiden Metaboliten im Pyrimidinstoffwechsel durch Allopurinol wird mit einer Hemmung der OMP-Decarboxylase über Allopurinol-7-N-Ribonucleotid erklärt (1). Nach

weiteren Untersuchungen von Beardmore und Kelley (4) kommt die Hemmung an der OMP-Decarboxylase sowohl durch Allopurinol, als auch durch Oxipurinol und deren Ribonucleotidderivate (AT, OT, Oxipurinol-1-N-Ribonucleotid) zustande.

2.3 Wirkung von Benzbromaron auf die Purin- und Pyrimidinbiosynthese

Den harnsäuresenkenden Effekt von Benzofuranen beschrieb Nivet im Jahre 1965 (20). Heute findet Benzbromaron in der Klinik Anwendung als Uricosuricum. Nachdem man lange vermutete, der serumharnsäuresenkende Effekt sei lediglich Ausdruck einer vermehrten Uricosurie, gibt es heute Hinweise für einen weiteren Wirkungsmechanismus von Benzbromaron, nämlich den eines direkten Einflusses auf den Purinstoffwechsel. Dieser mögliche Effekt sollte durch vorliegende Untersuchungen nachgeprüft werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Untersuchungen an der Purinbiosynthese der Neurospora crassa-Kulturen

3.1.1 Methodik

Die Geschwindigkeit der de novo Purinbiosynthese wurde durch Bestimmung der ^{14}C -FGAR-Bildung in Gegenwart von Azaserin nach der Methode von Rosenbloom et al (21) und Kelley und Wyngaarden (16) gemessen.

Azaserin hemmt die Purinbiosynthese auf der Stufe von FGAR (Formylglycinamidribonucleotid). Bietet man *Neurospora crassa*-Kulturen markiertes Glycin an, so erfolgt neben den bekannten Stoffwechselwegen des Glycins auch Einbau in FGAR, das über Säulenchromatographie abgetrennt und mittels seiner Radioaktivität bestimmt werden kann. Aus der während einer bestimmten Zeit anfallenden FGAR-Menge läßt sich im Vergleich zu Kontrollversuchen auf die Geschwindigkeit der Purinbiosynthese schliessen, da FGAR selbst nicht zu einer Rückkoppelung auf den ersten Schritt der Synthesekette führt.

3.1.2 Materialien

Ionenaustauscher Dowex 1 x 8; mesh 200 - 400;

Gegenion HCOO^-

Azaserin, Ameisensäure 0,5 n, Ameisensäure 4 n,

Stopplösung (Glycin 1 n in Ameisensäure 1 n)

^{14}C Glycin 0,05 mCi pro 37 mg (New England Nuclear)

3.1.3 Versuchsverlauf

Je 11,5 ml *Neurospora crassa*-Kultur wurden mit je 0,5 ml vorbereiteter Substanzstammlösungen bzw. -suspensionen so versetzt, daß die Endkonzentrationen der zu prüfenden Substanzen stufenweise 10^{-3}M bis 10^{-6}M waren. Im Wasserbad bei 27°C erfolgte unter Insufflation von Luft 15-minütige Vorinkubation und gründliche Vermischung

der Stammlösungen. Anschließend wurde Azaserin (Endkonzentration 50 Gamma pro ml Kultur) und ^{14}C -Glycin (0,2 μCi pro ml Kultur) zugesetzt und bei sonst unveränderten Bedingungen 30 Minuten inkubiert. Zusatz eines Überschusses unmarkierten Glycins in Ameisensäure gelöst (2 ml Stopplösung) beendete den Versuch. Vor Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -40°C tiefgefroren.

Zum Aufschluß mußten die Konidien nach kurzzeitigem, schnellem Auftauen mehrfach unter Standardbedingungen gemahlen werden. Zwei Milliliter der Suspension wurden auf Dowexsäulen aufgebracht, nicht inkorporiertes ^{14}C -Glycin mit 3 x 8 ml 0,5 n Ameisensäure ausgewaschen und anschließend zur Messung das entstandene ^{14}C -FGAR mit 3 x 5 ml 4 n Ameisensäure von den Säulen eluiert. Je 1,5 ml des Eluats gelangte im TriCarb zur Zählung. Als Szintillatorlösung dienten je Messung 13ml Aquasol.

Wir wählten *Neurospora crassa* wegen ihrer relativ kurzen Verdoppelungszeit von 4 - 5 Stunden (wild strain 74 a). Herr Priv. Doz. Dr. W. Neupert, Institut für Physiologische Chemie und Physikalische Biochemie der Universität München, überließ uns freundlicherweise die Kulturen. Die Anzucht erfolgte 14 Stunden lang bei 27°C unter Luftinsufflation im Wasserbad. Pro Liter Vogel's Medium wurden 20 ml

Konidienstammlösung (10^8 Konidien pro ml) zugesetzt.
Am Versuchsbeginn betrug der Proteingehalt ca 3 mg pro ml (gemessen mit der Biuretmethode nach dem standardisierten Mahlen).

Vogel's Medium

20 ml Vogel's Minimalmedium

40 ml Saccharoselösung 50 %

auf 1000 ml Aqua dest.

Vogel's Minimalmedium (50-fach)

150 gr Natriumcitrat ($\times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

250 gr Kaliumdihydrogenphosphat (wasserfrei)

100 gr Ammoniumnitrat (wasserfrei)

10 gr Magnesiumsulfat ($\times 7 \text{ H}_2\text{O}$)

5 gr Calciumchlorid ($\times 2 \text{ H}_2\text{O}$)

2,5 ml Biotinlösung (5,0 Biotin auf 50 ml Äthanol 50%

2,5 ml Spurenelementlösung

750 ml Aqua dest.

3.2 Untersuchung der Pyrimidinbiosynthese an *Neurospora crassa*-Kulturen.

3.2.1 Methodik

Orotidin-5-Phosphat-Pyrophosphorylase wandelt die im Ablauf der Pyrimidinbiosynthese entstehende Orotsäure zu Orotidin-5-Phosphat. Unter Kohlendioxidabspaltung bildet anschließend die ODC Uridinmonophosphat.

Bei vorliegenden Untersuchungen stellte das mittels ODC aus ursprünglich angebotener ^{14}C -Carboxyl-markierter Orotsäure freigesetzte $^{14}\text{CO}_2$ ein Maß für die Geschwindigkeit der Pyrimidinsynthese während der Inkubationszeit dar.

3.2.2 Materialien

Orotsäure (New England Nuclear; Carboxylgruppe ^{14}C -markiert)

Kalilauge 4 n, Perchlorsäure 1,5 n

3.2.3 Versuchsverlauf

Je 0,4 ml Kalilauge 4 n wurde in die Absorptionsvorlagen von Warburggefäßen pipettiert und die so vorbereiteten Reaktionsgefäße geschlossen bereitgehalten. Der Vorinkubation (wie unter 3.1.3 beschrieben) folgte der eigentliche Versuch, indem wir je 2 ml Kultur in die Reaktionsgefäße einbrachten und den Versuch durch Zusatz von ^{14}C -markierter Orotsäure (0,5 μCi pro Ansatz) starteten. Zusatz von 1 ml Perchlorsäure 1,5 n beendete die 45-minütige Versuchsdauer. Zur Messung gelangte die zur Absorption vorgelegte Kalilauge mit 13,5 ml Aquasol im TriCarb.

3.3 Untersuchung der Purinbiosynthese an Fibroblasten-Kulturen

3.3.1 Methodik

Die Untersuchung der Purinbiosynthese an den Fibroblasten-

Kulturen unterschied sich lediglich durch die Bestimmungsmethode vom Prinzip der *Neurospora crassa*-Kulturen. Statt durch Säulenchromatographie erfolgte die Abtrennung von ^{14}C -FGAR durch Hochspannungspapierchromatographie.

3.3.2 Materialien

0,25 % Trypsinlösung (in isotonischer Kochsalzlösung)
physiologische Kochsalzlösung

Krebs-Ringer-Phosphat Medium pH 7,4

Äthanol 80 Vol%

Whatman No. 3 MM Papier

0,05 M Boratpuffer pH 7,4 mit 0,001 M EDTA

Glycin p.A, Glucose p.A, Azaserin, L-Glutamin p.A

^{14}C Natriumformiat

3.3.3 Versuchsverlauf

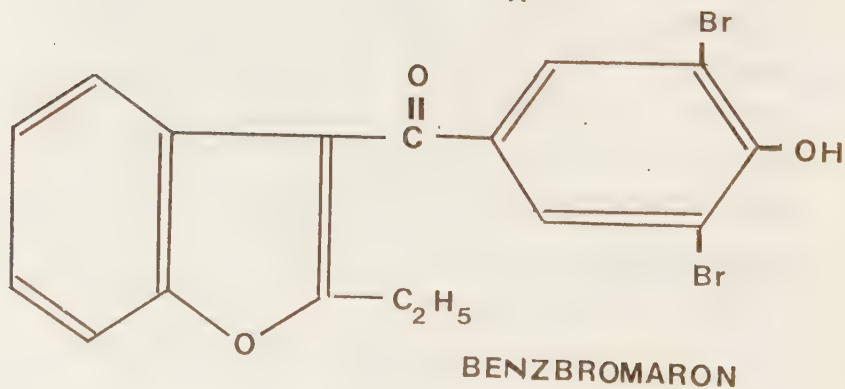
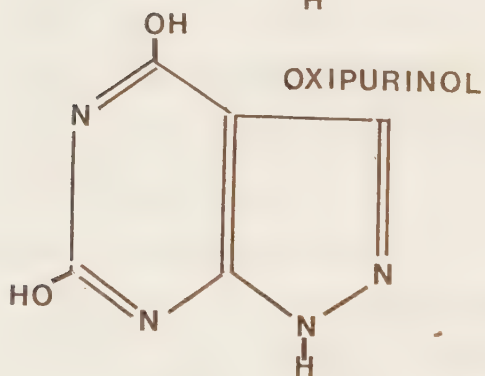
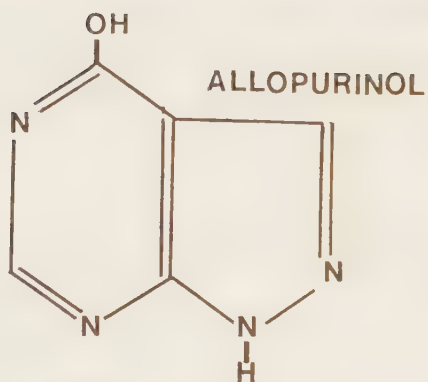
Für die Überlassung der Fibroblastenkulturen zur Durchführung dieser Versuche bin ich Herrn Dr. Klaus Stocker, Medizinische Poliklinik München, besonders zu Dank verpflichtet. Fibroblasten aus Hautbiopsien gesunder Personen wurden im wesentlichen nach der Methode von Rosenbloom et al (21), als Monolayerkulturen (Falcon-Plastikflaschen 75 ccm oder Glasflaschen) in Dulbeccos MEM unter Zusatz von fötalem Kalbsserum (10 %), Glutamin (20 mmol) Antibiotika (Penicillin und Streptomycin je 50 E/pro ml) und Hepes als Puffersubstanz (pH 7,2) gezüchtet.

Zu den Versuchen wurden die Fibroblasten mit Trypsin von der Oberfläche gelöst, dreimal mit Krebs-Ringer Medium gewaschen und das abzentrifugierte Zellkonglomerat in einem Glas (mit bekanntem Gewicht) gewogen. 8 - 16 mg Zellen (Feuchtgewicht pro Versuchsansatz) wurden dann in 0,5 ml Krebs-Ringer Medium suspendiert und bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. Anschließend wurden Glucose (5,5 mmol), Glycin (4 mmol) und Azaserin (0,3 mmol), gelöst in je 0,1 ml PBS und 0,1 ml der Testsubstanzen (Endkonzentrationen 10^{-6} bis 10^{-3} M) dazupipettiert und die Zellsuspension bei 37°C 15 Minuten inkubiert. Nach dieser Vorinkubation wurde L-Glutamin (Endkonzentration 20 mmol) und ^{14}C Natriumformiat (Endkonzentration 1,52 mmol - 1 μCi) zugesetzt und der Versuch unter sonst unveränderten Bedingungen fortgesetzt. Alle Arbeitsvorgänge erfolgten unter sterilen Bedingungen. Nach 4 Stunden wurde nichtverbrauchtes ^{14}C Natriumformiat durch Abzentrifugieren des Inkubationsmediums entfernt, das entstandene ^{14}C FGAR in 80 %-igem Äthanol aufgenommen, von anderen aktiven Bestandteilen durch Hochspannungselektrophorese (9 KV, 35 mA eine Stunde Laufzeit) abgetrennt und im Szintillationszähler mit 15 ml Aquasol ausgezählt.

3.4 Untersuchung der Pyrimidinbiosynthese an Fibroblasten-Kulturen

Bei der Untersuchung der Pyrimidinbiosynthese wurden

ABB 2

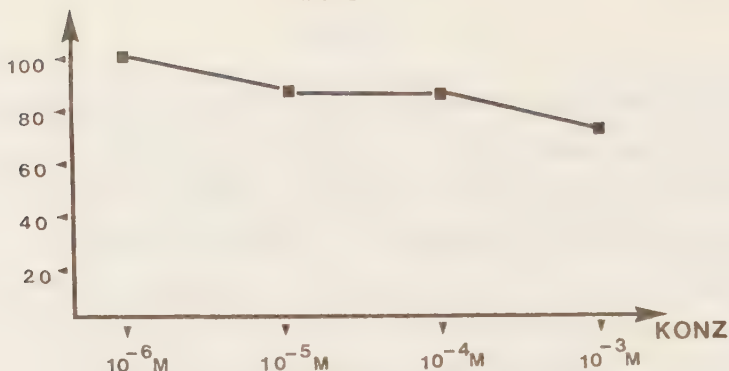


Methodik und Materialien gleich den Versuchen von *Neurospora crassa* gewählt. Je 1 ml Suspension (wie unter 3.3.3 beschrieben) gewaschener Fibroblasten wurden in sterilierte Warburggefäße pipettiert, die bereits Kalilauge als Absorbens und Stammlösungen bzw. -suspensionen in den entsprechenden Konzentrationen unserer Versuchssubstanzen enthielten. Nach Beendigung des Versuches wurde wiederum an Kalilauge absorbiertes $^{14}\text{CO}_2$ mit 13,5 ml Aquasol im TriCarb gezählt.

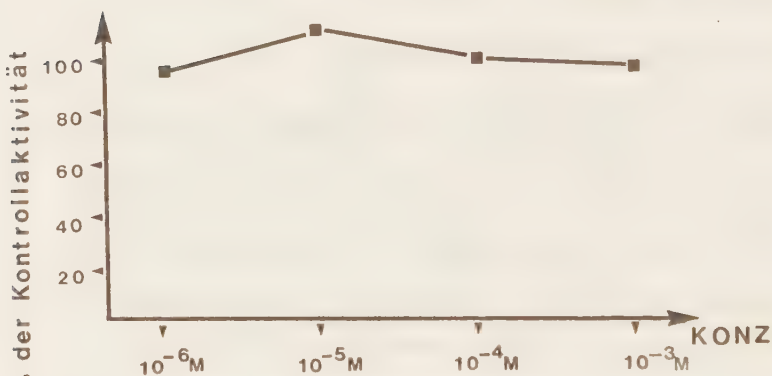
3.5 Untersuchte Substanzen (Abb. 2)

Nachdem die Wirkungsweise von Allopurinol und Oxipurinol bzw. deren Metaboliten auf die Purin- und Pyrimidinbiosynthese noch nicht völlig aufgeklärt ist, untersuchten wir den Einfluß dieser Substanzen an *Neurospora crassa*-Kulturen und zum Teil an menschlichen Fibroblasten. Hierfür stellte uns die Firma Henning in Berlin die entsprechenden chemisch synthetisierten Substanzen freundlicherweise zur Verfügung. In gleicher Weise wurde der Einfluß von Benzbromaron auf den Purin- und Pyrimidin-stoffwechsel von *Neurospora crassa*-Kulturen und an menschlichen Fibroblasten geprüft.

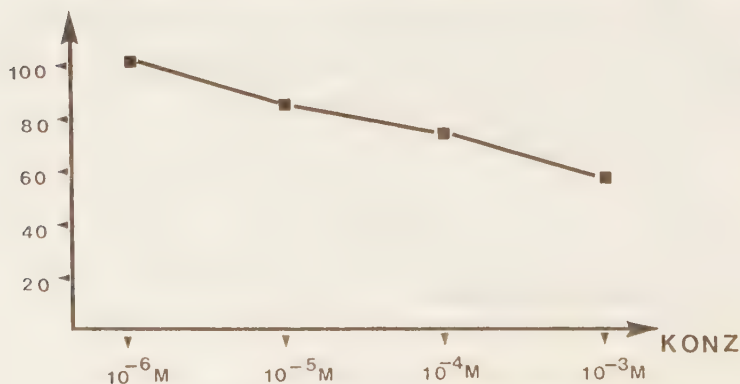
Abb 3



Einfluß von ALLOPURINOL auf
PURINBIOSYNTHESE von *NEUROSPORA CRASSA*



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOSID auf
PURINBIOSYNTHESE von *NEUROSPORA CRASSA*



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOTID auf
PURINBIOSYNTHESE von *NEUROSPORA CRASSA*

4. Ergebnisse

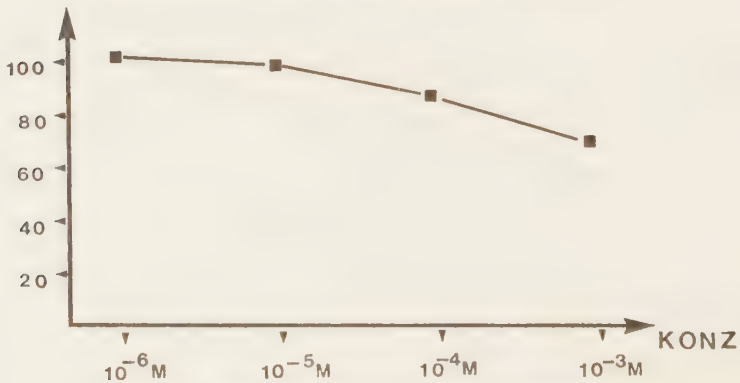
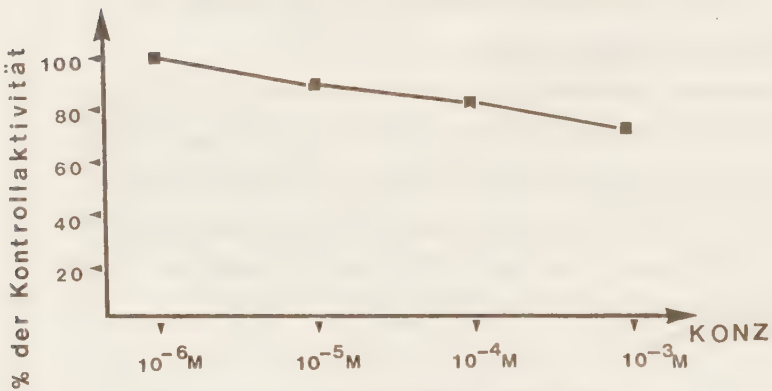
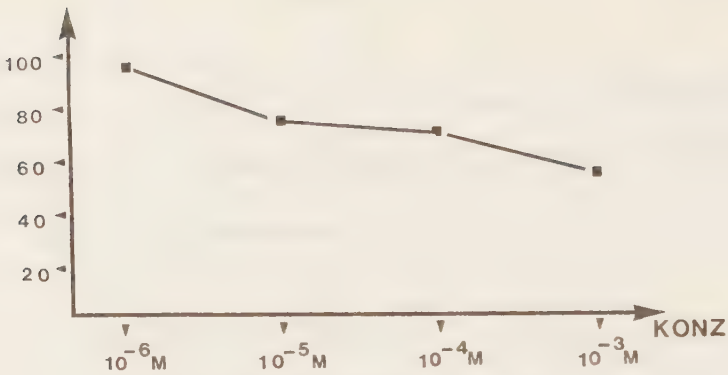
4.1 Purinbiosynthese der *Neurospora crassa*

4.1.1 Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid (Abb. 3)

Allopurinol zeigt auf die Bildungsrate von ^{14}C -FGAR, d.h. auf die Purinsynthesegeschwindigkeit erst bei Konzentrationen um 10^{-3}M eine signifikante Wirkung. Bei niedrigeren Konzentrationen ist die Hemmung nur geringgradig ausgeprägt.

Allopurinolribonucleosid zeigt unter unseren in vitro-Untersuchungen einen noch weniger ausgeprägten Einfluß, während Allopurinolribonucleotid eine deutlich von der Konzentration abhängige Syntheseverminderung ergibt, die bei 10^{-5}M etwa 20 %, bei 10^{-4}M etwa 25 % und bei 10^{-3}M etwa bei 45 % liegt (Abb. 3).

Abb 4



4. Ergebnisse

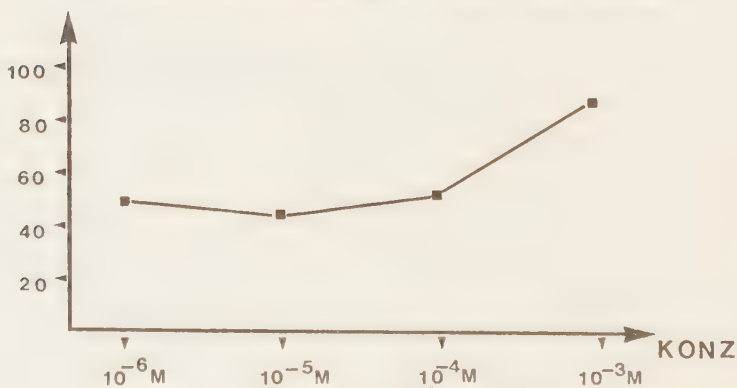
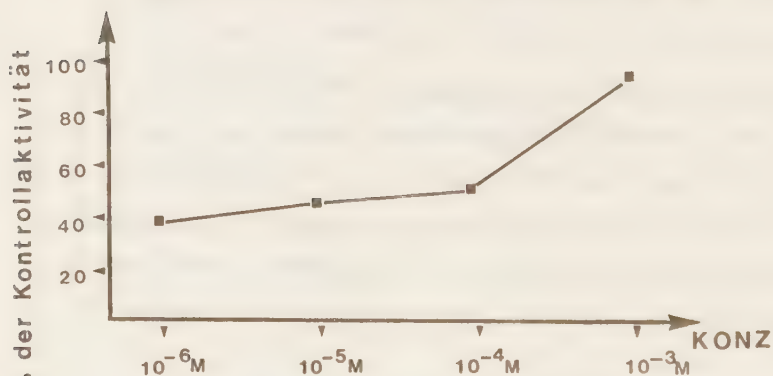
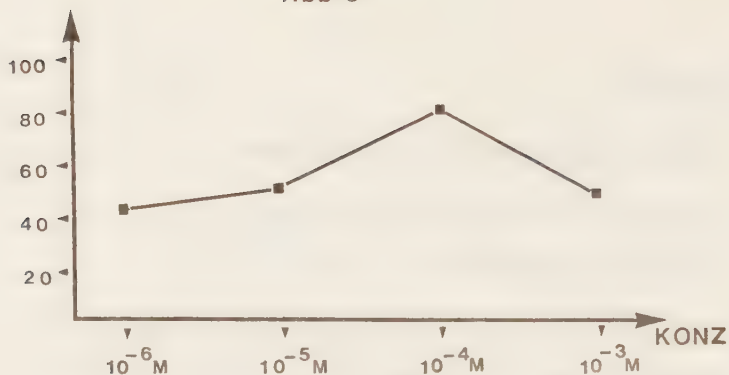
4.1 Purinbiosynthese der *Neurospora crassa*

4.1.2 Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid (Abb. 4)

Oxipurinolzugabe zum Inkubationsmedium vermindert die FGAR-Synthese bereits in einer Konzentration von 10^{-5}M um etwa 30 % deutlich. Höhere Konzentrationen bewirken eine weitere Senkung der Syntheserate. Sie beträgt bei einer Konzentration von 10^{-3}M annähernd 45 %.

Die Oxipurinolribonucleosidzugabe führt zu einer beinahe linearen konzentrationsabhängigen Hemmung von etwa 15 % bei 10^{-5}M auf etwa 30 % bei 10^{-3}M . Interessanterweise verläuft bei Oxipurinolribonucleosidzusatz die Hemmung annähernd parallel zu der unter Oxipurinolribonucleotidzugabe (Abb. 4).

Abb 5



4. Ergebnisse

4.2 Pyrimidinbiosynthese der *Neurospora crassa*

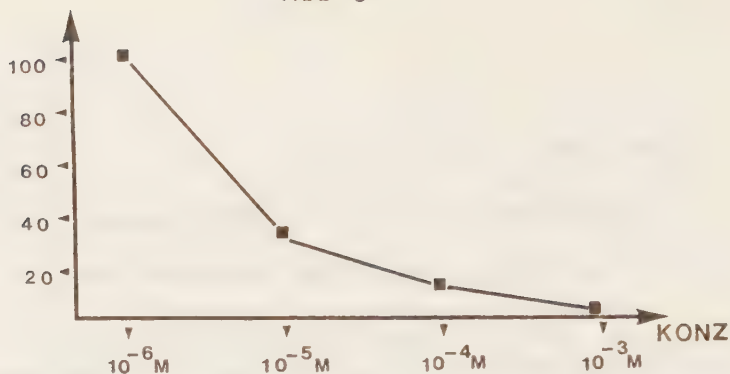
4.2.1 Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid (Abb. 5)

Die Pyrimidinbiosynthese von *Neurospora crassa*-Kulturen hemmt Allopurinol in allen hier untersuchten Konzentrationen deutlich. Im Mittelwert läßt sich zwischen den Konzentrationen 10^{-6}M bis 10^{-3}M eine durchschnittliche Hemmung von etwa 50 % erkennen. Der deutlich verminderte Hemmeffekt bei 10^{-4}M auf etwa 20 % ließ sich in mehreren Serien nachweisen und ist somit nicht über technische Mängel des Versuchsablaufs zu erklären.

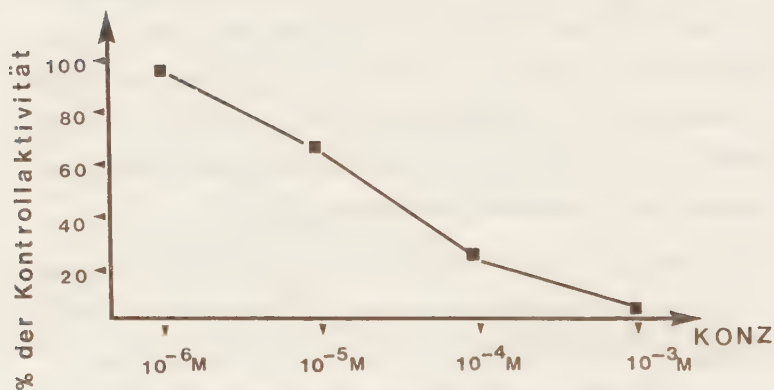
Allopurinolribonucleosid vermindert die Pyrimidinsynthese bereits in Konzentrationen von 10^{-6}M über 60 %. Ähnlich große Hemmeffekte zeigen auch die Konzentrationen 10^{-4}M und 10^{-5}M , während die höchste von uns untersuchte Konzentration von 10^{-3}M die geringste Senkung der Pyrimidinsynthese ergibt.

Annähernd parallel mit Allopurinolribonucleosid verlaufen die beobachteten Ergebnisse bei Allopurinolribonucleotidzugabe zum Inkubationsmedium (Abb. 5).

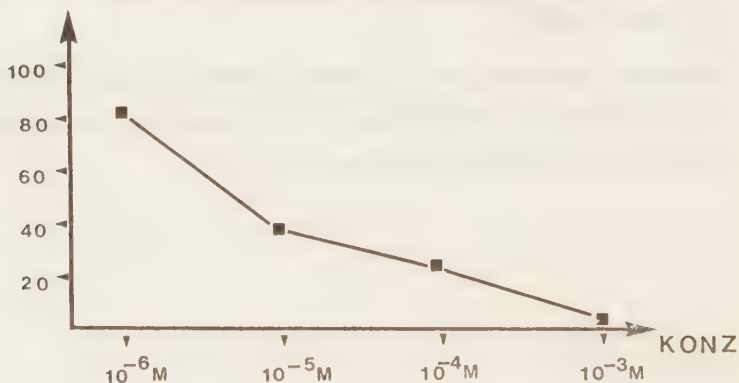
Abb 6



Einfluß von OXIPURINOL auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE von NEUROSPORA CRASSA



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOSID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE von NEUROSPORA CRASSA



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOTID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE von NEUROSPORA CRASSA

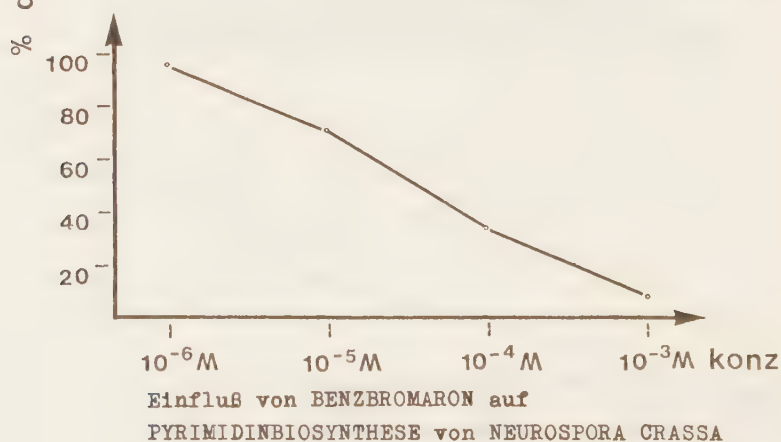
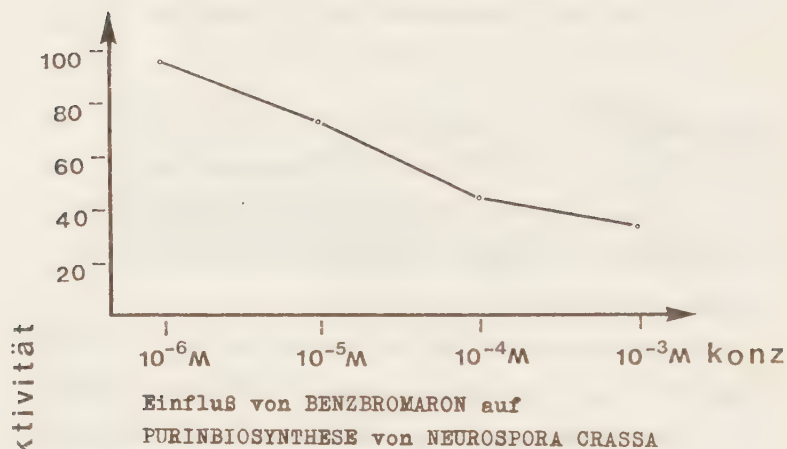
4. Ergebnisse

4.2 Pyrimidinbiosynthese der *Neurospora crassa*

4.2.2 Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid (Abb. 6)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Zugabe von A, AS und AT zeigt sich in der Pyrimidinbiosynthese bei den Verbindungen des Oxipurinols ein weitaus deutlicherer konzentrationsabhängiger Hemmeffekt. Bei allen drei Substanzen ist dieser Effekt nahezu identisch, d. h. die konzentrationsabhängige Hemmung verläuft in etwa parallel. Die Pyrimidinbiosynthese wird durch Oxipurinol in einer Konzentration von 10^{-5}M über 60 %, durch Oxipurinolribonucleosid bei 10^{-5}M um 35 % und von Oxipurinolribonucleotid der Konzentration 10^{-5}M ebenfalls über 60 % herabgesetzt. Bei Konzentrationen von 10^{-3}M ist die Pyrimidinsynthese bei allen drei Substanzen um mehr als 90 % gehemmt (Abb. 6).

Abb 7



4. Ergebnisse

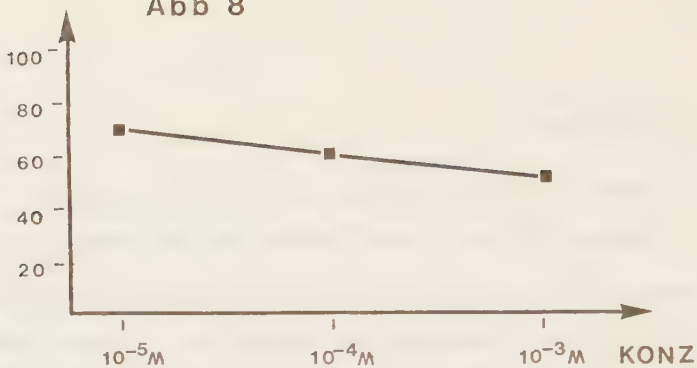
4.3 Purin- und Pyrimidinbiosynthese von *Neurospora*

crassa-Kulturen unter Einfluß von Benzbromaron (Abb.7)

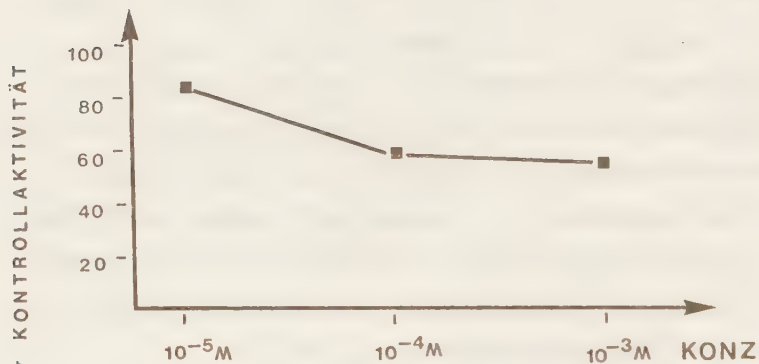
Zugabe von Benzbromaron zu *Neurospora crassa*-Kulturen führt zu einer konzentrationsabhängigen, linearen Verminderung der ^{14}C -FGAR Synthese. Bei 10^{-6}M ist gegenüber den Kontrollwerten keine signifikante Hemmung zu beobachten, bei 10^{-5}M beträgt sie etwa 30 %, bei 10^{-4}M circa 55 % und bei 10^{-3}M annähernd 70 %.

Ähnlich den Beobachtungen der Purinbiosynthese führt Benzbromaron in Kulturen von *Neurospora crassa* zu einer konzentrationsabhängigen, deutlichen Verminderung der Pyrimidinsynthese. Die Hemmung wird erstmals signifikant bei einer Konzentration von 10^{-5}M und beträgt annähernd 30 %. Bei 10^{-3}M erfolgt eine beinahe vollständige Aufhebung der Pyrimidinbiosynthese (Abb. 7).

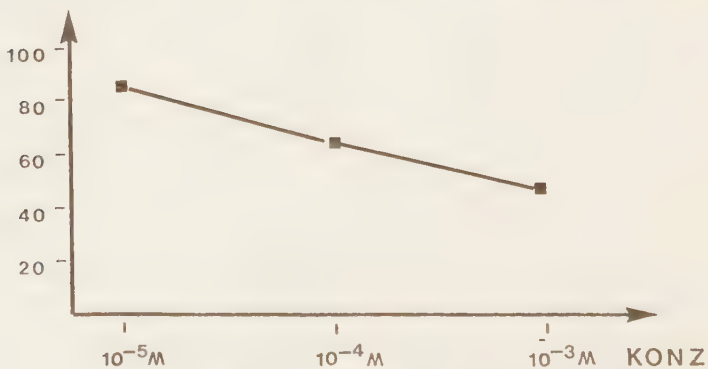
Abb 8



Einfluß von ALLOPURINOL auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOSID auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOTID auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN

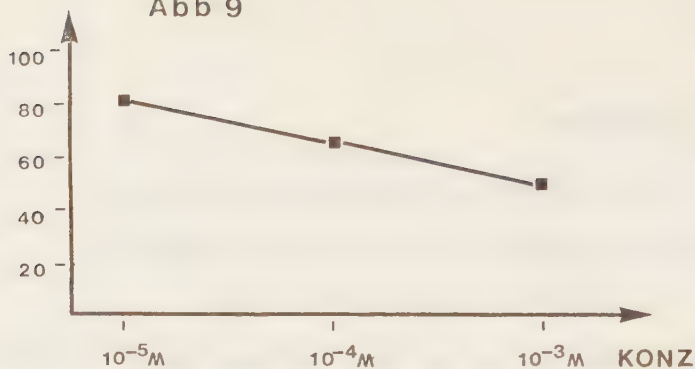
4. Ergebnisse

4.4 Purinbiosynthese menschlicher Fibroblasten

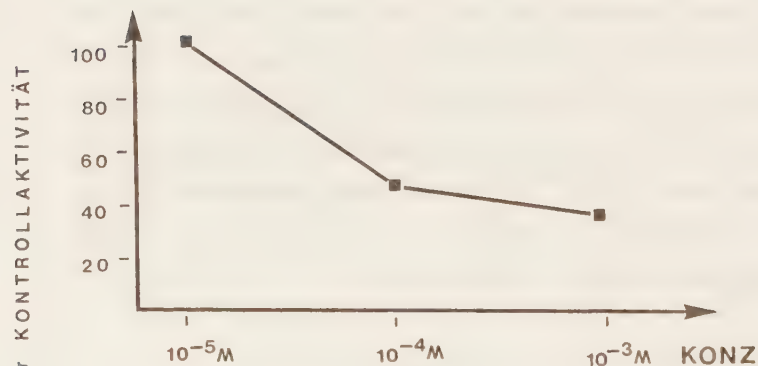
4.4.1 Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid (Abb. 8)

Auf Grund vorliegender Untersuchungen hemmt Allopurinol, ähnlich dem Oxipurinol, die Purinsynthese menschlicher Fibroblasten. Bei einer Konzentration von 10^{-5}M im Inkubationsmedium beträgt die Hemmung zwischen 25 % und 30 %. Bei 10^{-4}M erhöht sie sich auf ca. 40 % und beträgt bei 10^{-3}M annähernd 50 %. Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid lassen bei der Hemmung der ^{14}C -FGAR Synthese untereinander und im Vergleich zu Allopurinol nur unwesentliche Unterschiede erkennen (Abb. 8).

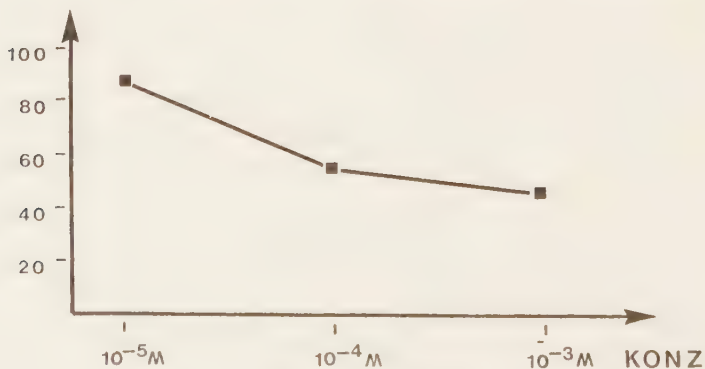
Abb 9



Einfluß von OXIPURINOL auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOSID auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOTID auf PURINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN

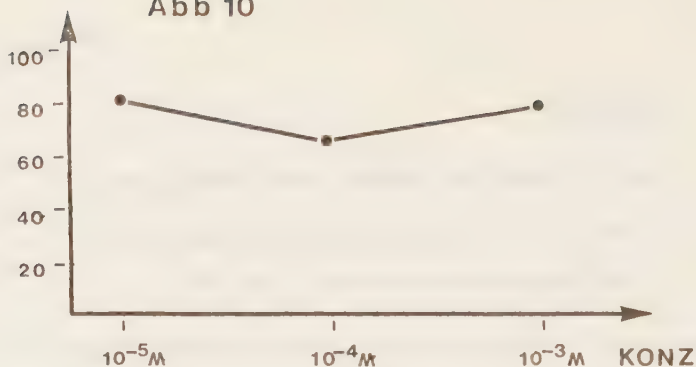
4. Ergebnisse

4.4 Purinbiosynthese menschlicher Fibroblasten

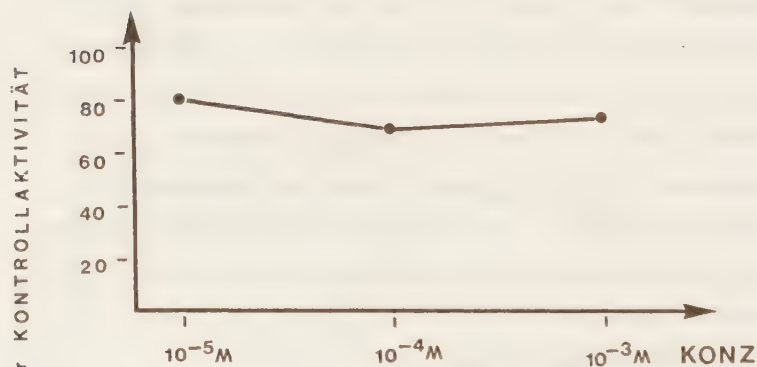
4.4.2 Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid (Abb. 9)

Oxipurinol und seine von uns untersuchten Derivate scheinen sich auf Grund der hier vorliegenden Untersuchungen bezüglich der Auswirkung auf die ^{14}C -FGAR Synthese nicht wesentlich von den Ergebnissen zu unterscheiden, die sich mit Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid erreichen lassen. Die Einflüsse sind in ihrer Konzentrationsabhängigkeit nahezu parallel. Lediglich Oxipurinolribonucleosid hemmt in der geringsten von uns untersuchten Konzentration nicht. Auch Oxipurinolribonucleotid zeigt nur bei Konzentrationen von 10^{-4}M und 10^{-3}M eine bemerkenswerte Hemmwirkung (Abb. 9).

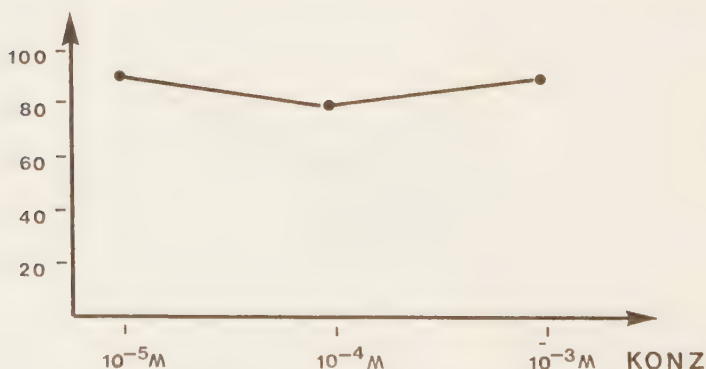
Abb 10



Einfluß von ALLOPURINOL auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOSID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von ALLOPURINOLRIBONUCLEOTID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN

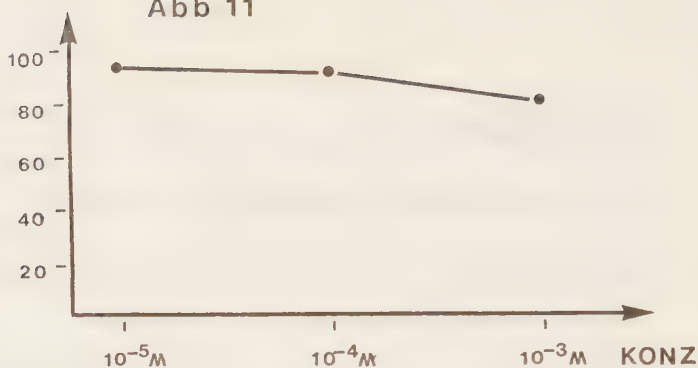
4. Ergebnisse

4.5 Pyrimidinsynthese menschlicher Fibroblasten

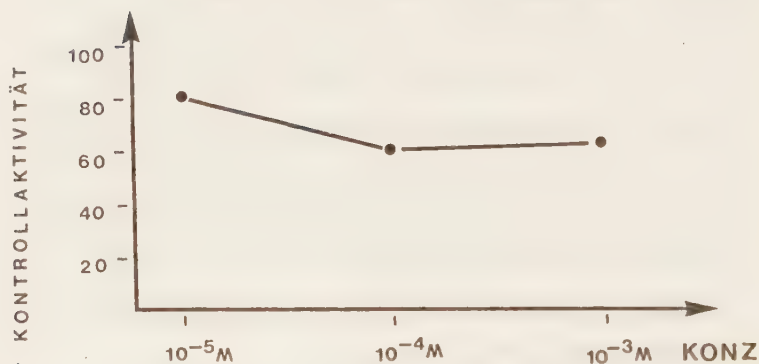
4.5.1 Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid (Abb. 10)

Bei Allopurinol und Allopurinolribonucleosid kommt es zu einer Verminderung der Pyrimidinsynthese im Bereich zwischen 20 % und 30 % bei Konzentrationen von 10^{-4} M und 10^{-5} M. Eine Steigerung der Konzentration auf 10^{-3} M bewirkt in beiden Fällen eine geringgradig ausgeprägte Verminderung der Pyrimidinbiosynthese. Zugabe von Allopurinolribonucleotid zeigt bei der vorliegenden Untersuchung einen weniger ausgeprägten Hemmeffekt und zwar 15 % bis 20 % Hemmung im Bereich aller von uns untersuchten Konzentrationen (Abb. 10).

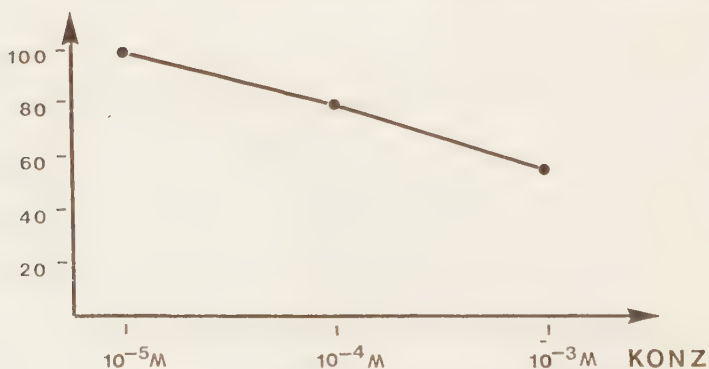
Abb 11



Einfluß von OXIPURINOL auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOSID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN



Einfluß von OXIPURINOLRIBONUCLEOTID auf
PYRIMIDINBIOSYNTHESE menschlicher FIBROBLASTEN

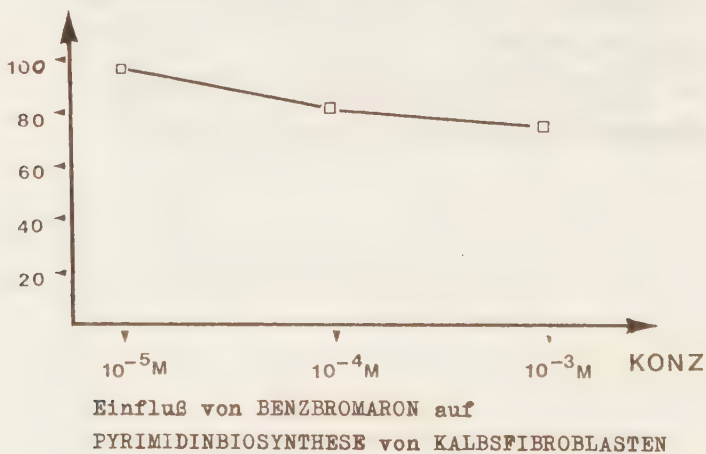
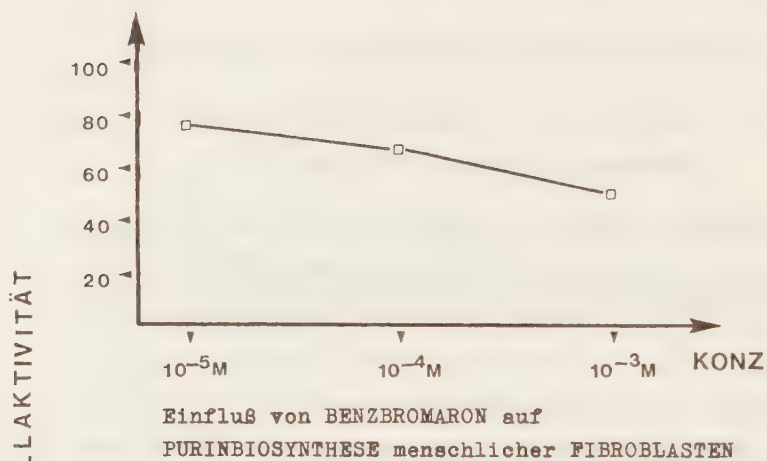
4. Ergebnisse

4.5 Pyrimidinsynthese menschlicher Fibroblasten

4.5.2 Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid (Abb. 11).

Oxipurinol hemmt die Pyrimidinbiosynthese konzentrationsabhängig bis zu einem Ausmaß von ca. 20 % bei 10^{-3}M im Inkubationsmedium. Verglichen zu Allopurinol ist der Hemmeffekt etwas geringer ausgeprägt. Oxipurinolribonucleosid zeigt entsprechend vorliegender Untersuchungen einen etwas deutlicheren Hemmeffekt (ca. 40 % bei 10^{-4}M und 10^{-3}M), ein Ergebnis, wie es sich auch in ähnlicher Weise bei Allopurinolribonucleosidzugabe zeigt. Oxipurinolribonucleotid läßt eine konzentrationsabhängige, deutliche Senkung der Pyrimidinsynthese erkennen. Sie beträgt bei 10^{-4}M ca. 20 % und bei 10^{-3}M annähernd 40 % (Abb. 11).

Abb 12



4. Ergebnisse

4.6 Purin- und Pyrimidinbiosynthese von Fibroblasten unter dem Einfluß von Benzbromaron (Abb. 12)

Zugabe von Benzbromaron zu einer Kultur menschlicher Fibroblasten vermindert die ^{14}C -FGAR Synthese signifikant. Eine Konzentration von 10^{-5}M zeigt eine Abnahme von 20 %, 10^{-4}M ca. 30 % und 10^{-3}M annähernd 40 % der Kontrollaktivität.

Die Pyrimidinsynthese von Kulturen fötaler Kalbsfibroblasten erfährt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung. Die Verminderung der Synthese beträgt bei 10^{-4}M etwa 15 % und bei 10^{-3}M annähernd 20 % (Abb. 12).

5. Diskussion

5.1 Purinbiosynthese unter Einwirkung von Allopurinol und dessen Metaboliten

Der Haupteinfluß von Allopurinol auf die Purin- und Harnsäuresynthese darf zweifellos auf seine Wirkung als kompetitiver Inhibitor der Xanthinoxidase zurückgeführt werden. Wahrscheinlich kommt diese Hemmwirkung durch Bindung des Allopurinoloxidaionsproduktes Oxipurinol an einen, an das Enzym Xanthinoxidase gebundenen, Molybdäncofaktor zustande, der einen niedrigeren Wertigkeitszustand aufweist, als er im aktiven Enzym vorliegen würde (19). Durch den weiteren Stoffwechsel des Allopurinols selbst kommt es aber, zumindest indirekt, zu einer zusätzlichen pharmakologischen Wirkung im Bereich des Purinstoffwechsels und sicher zu einer im Bereich des Pyrimidinstoffwechsels.

Bei den meisten Patienten, und hier insbesondere bei solchen mit einer Überproduktion von Harnsäure, bewirkt eine Therapie mit Allopurinol eine Verminderung der Gesamtkörperpurinsynthese und eine Herabsetzung der renalen Exkretion der Gesamtpurinkörper. Diese Wirkung hängt von der Enzymaktivität der HG-PRT ab, das setzt eine vorausgehende Umwandlung von Allopurinol zu Allopurinolribonucleotid voraus (14).

Theoretisch könnte nun eine Hemmung der de novo Purinsynthese auf der Grundlage bzw. als Folge dieser Reaktion zustande kommen durch

- a) einen Mangel des geschwindigkeitsregulierenden Substrates PRPP (indem es bei der Umwandlung von Allopurinol zu Allopurinolribonucleotid bzw. Oxipurinol zu Oxipurinolribonucleotid verbraucht wird)
- b) Akkumulation von Nucleotidderivaten aus Xanthin und Hypoxanthin, die bei der Hemmung der Xanthinoxidase entstehen und über ihre Konzentrationserhöhung den ersten Schritt der Purinsynthese an der PRPP-Amidotransferase direkt hemmen können oder
- c) eine Hemmung durch die aus Allopurinol oder Oxipurinol entstehenden Metaboliten und zwar wiederum direkt an der PRPP-Amidotransferase.

Zugabe dieser verschiedenen chemisch reinen Substanzen zu Kulturen von *Neurospora crassa* und Fibroblasten sollte den Gesamtkörpereinfluß dieser Substanzen ausschalten. Wenn sich auch der gegenseitige Metabolismus in diesen Kulturen nicht ausschließen ließ, so sollten diese Untersuchungen im wesentlichen dem Ziel dienen, aus den relativen Hemmwirkungen der einzelnen Substanzen Rückschlüsse auf den stärksten Inhibitor der Purinbiosynthese schliessen zu können.

Der beobachtete Hemmeffekt von Allopurinol auf die Purinbiosynthese der Kulturen von *Neurospora crassa* ist

theoretisch möglich als Folge

- a) einer Allopurinolribonucleotidhemmung, da die Kulturen wie menschliches Gewebe HG-PRT aufweisen
- b) eines Oxipurinolribonucleotideffektes, indem die Xanthinoxidase Allopurinol zu Oxipurinol umwandelt und die Bildung von Oxipurinolribonucleotid durch O-PRT sich anschließt (Abb. 1)
- c) eines Allopurinolribonucleotideffektes, indem über das Zwischenprodukt Allopurinolribonucleosid (durch eine Purinnucleosid-Phosphorylase) Allopurinolribonucleotid (durch eine Nucleosidkinase) entstanden ist.

Dieser dritte Mechanismus erscheint jedoch auf Grund unserer Untersuchung zumindest an *Neurospora crassa*-Kulturen äußerst unwahrscheinlich, da durch Zugabe von Allopurinolribonucleosid praktisch keine nennenswerte Hemmung zu erreichen war. Letztgenannter Mechanismus ist jedoch für die menschlichen Fibroblasten nicht auszuschließen, das bedeutet, daß

entweder Allopurinolribonucleosid zu Allopurinolribonucleotid umgewandelt werden kann
oder Allopurinol selbst, d.h. ohne vorherige Metabolisierung, einen direkten Hemmeffekt ausübt.

Auf Grund der bisherigen Literatur erscheint der Hemmeffekt durch entstehendes Allopurinolribonucleotid wahrscheinlicher. Hierfür sprechen auch die Ergebnisse

über den Einfluß von Allopurinolribonucleotid an Kulturen von *Neurospora crassa*, denn auch hier hemmt Allopurinolribonucleotid signifikant.

Voraussetzung für einen direkten Vergleich der konzentrationsabhängigen Hemmung zwischen Allopurinol und dessen Ribonucleotid wäre der ungehinderte Eintritt des Nucleotids durch die Zellmembran. Zieht man zum Vergleich die Membranpermeabilität natürlicher Ribonucleotide heran, erscheint dies eher unwahrscheinlich.

Nach unseren Ergebnissen über den Einfluß von Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid auf die Purin- de novo Synthese ist zu überlegen, ob Allopurinol nach direkter Umwandlung zu Allopurinolribonucleotid durch die HG-PRT seine hemmende Wirkung auf die Purinsynthese entfalten könnte. Diese Theorie hätte man untermauern können, wenn Allopurinolribonucleotidzugabe direkt einen höheren Hemmeffekt entfaltet hätte. Ein unmittelbarer Vergleich der konzentrationsabhängigen Hemmwirkung zwischen Allopurinol und Allopurinolribonucleotid kompliziert sich jedoch durch die Frage des freien Zugangs des Nucleotids in die Zelle. Bei einem hohen Angebot von Allopurinolribonucleotid außerhalb der Zelle läßt sich die Diffusion eines Teils des Nucleotids durch die Zellmembran nicht ausschließen. Anders erklärt sich der Hemmeffekt von Allopurinolribonucleotid

kaum, wenn nicht Allopurinolribonucleotid, durch eine in der Zellmembran lokalisierte Nucleotidase zu Allopurinol-1-N-Ribonucleosid umgewandelt, in die Zelle diffundiert, hier nach weiterem Abbau zu Allopurinol wieder durch die HG-PRT in Allopurinolribonucleotid übergeführt wird und als solches in der Zelle seine Hemmwirkung ausübt bzw. das so entstandene intrazelluläre Allopurinol durch die Xanthinoxidase zu Oxipurinol übergeführt wird und als solches oder als Oxipurinolmetabolit dann seine Hemmwirkung entfaltet.

Diese Untersuchungen über den Einfluß von Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid schließen eine unmittelbare Hemmwirkung von Allopurinol oder Allopurinolribonucleotid nicht aus. Könnte man die Diffusion von Allopurinolribonucleotid in die Zelle absichern, wäre dies aber bewiesen. Die beobachtete Hemmwirkung durch Allopurinolribonucleotid auf die Purinsynthese der Kulturen macht diesen Mechanismus trotzdem sehr wahrscheinlich.

Der bei Oxipurinol auf die Purinbiosynthese nachzuweisende Hemmeffekt läßt sich theoretisch zurückführen auf

- a) mittels O-PRT gebildetes Oxipurinolribonucleotid
- b) die Umwandlung von Oxipurinol in Oxipurinolribonucleosid (durch eine Uridinphosphorylase) mit nachfolgender Bildung von Oxipurinolribonucleotid (durch eine uridinspezifische Pyrimidinkinase) (Abb. 1).

Auf Grund des signifikanten Hemmeffektes von Oxipurinol-ribonucleosid scheint dieser Mechanismus wahrscheinlich. Theoretisch könnte der Oxipurinolribonucleosidhemmeffekt nur noch zustande kommen (außer über einen Oxipurinol-7-N-Ribonucleosidhemmeffekt) durch Rückumwandlung von Oxipurinol-7-N- Ribonucleosid zu Oxipurinol mit darauf folgender Bildung von Oxipurinolribonucleotid mittels O-PRT oder zu Oxipurinol-1-N-Ribonucleotid mittels HG-PRT oder noch weniger wahrscheinlich zu Oxipurinol-1-N-Ribonucleosid (Abb. 1).

Die annähernd parallele konzentrationsabhängige Wirkung von Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid spricht am ehesten für Oxipurinolribonucleotid als primäre Hemmsubstanz der Purinbiosynthese sowohl der Kulturen von *Neurospora crassa* als auch der menschlicher Fibroblasten. Jedoch ist auch hier wieder zu diskutieren, ob und in welcher Höhe das nucleotid die Zellmembran zu überwinden vermag. Auf Grund vorliegender Untersuchung läßt sich ein direkter Einfluß hoher Konzentrationen von Oxipurinol und Oxipurinolribonucleosid auf die Purinsynthese nicht ausschließen. Insgesamt würden diese Ergebnisse mit der Ansicht übereinstimmen, daß die Ribonucleotide von Allopurinol und Oxipurinol für den Hemmeffekt auf die Purinbiosynthese verantwortlich zu machen sind.

5.2 Pyrimidinbiosynthese unter Einwirkung von Allopurinol und dessen Metaboliten

Eine hemmende Wirkung von Allopurinol bzw. Allopurinol-metaboliten auf die Pyrimidinsynthese zeigten in vivo Untersuchungen an Ratten (5), an Menschen (10, 15) und an menschlichen Fibroblastenkulturen (17). Nach den bisherigen Untersuchungen (2, 11, 12 , 17) ist dieser Effekt auf eine Hemmwirkung an der OMP-Decarboxylase zurückzuführen und dies am ehesten durch Metaboliten von Oxipurinol.

Die Verabreichung von Allopurinol oder Oxipurinol an Menschen führt zu einer vermehrten Ausscheidung von Orotidin und im geringeren Ausmaß von Orotsäure im Urin (10, 15). Verabreicht man mit Allopurinol oder Oxipurinol behandelten Patienten carboxylmarkierte Orotsäure und mißt das abgeatmete $^{14}\text{CO}_2$, so findet man eine herabgesetzte Umwandlungsrate (2), ein Hinweis auf eine Blockierung im Bereich des Pyrimidinstoffwechsels. Verschiedene andere Untersuchungen (2, 10, 11, 12, 15, 17) erbrachten weitere Anzeichen, daß sowohl Allopurinol als auch Oxipurinol die Pyrimidinbiosynthese hemmen.

Auf Grund unserer Untersuchungen über den Einfluß von Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid auf die Pyrimidinsynthese der Kulturen von *Neurospora crassa* und menschlichen Fibroblasten ergeben sich

theoretisch gleiche Diskussionsmöglichkeiten wie im Falle der Purinsynthese. Lediglich bei *Neurospora crassa* sticht der ausgeprägtere Hemmeffekt von Allopurinol, Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid sogar in niedrigeren Konzentrationen hervor. Die auch an menschlichen Fibroblasten zu beobachtende parallele Wirkungsweise spricht am ehesten für das Ribonucleotid als Hauptwirksubstanz. Die nicht erklärbare Wirkungsabnahme von Allopurinolribonucleosid und Allopurinolribonucleotid in höheren Konzentrationen ist möglicherweise auf einen Feedbackmechanismus ungeklärter Art zurückzuführen.

Der deutliche konzentrationsabhängige Verlauf der Hemmwirkung von Oxipurinol, Oxipurinolribonucleosid und Oxipurinolribonucleotid in Kulturen von *Neurospora crassa* stimmt wiederum mit der Ansicht überein, daß Oxipurinolribonucleotid die Hauptwirksubstanz sei. Direkte Effekte von Oxipurinolribonucleosid (wie übrigens auch von Allopurinolribonucleosid) konnten diese Untersuchungen nicht ausschließen. Vom quantitativen Standpunkt aus ist jedoch bemerkenswert, daß Oxipurinol und dessen Metaboliten gegenüber Allopurinol mit Metaboliten die ausgeprägtere Hemmwirkung auf die Pyrimidinbiosynthese entfalten.

5.3 Pyrimidin- und Purinbiosynthese unter Einwirkung von Benzbromaron

Da im Rahmen der Behandlung mit Benzbromaron die beobachtete Senkung der Serumharnsäure nicht allein auf der Grundlage eines uricosurischen Effektes erklärt werden kann, wurde verschiedentlich - ähnlich wie für Allopurinol und Oxipurinol - für Benzbromaron ein zusätzlich hemmender Einfluß auf die de novo Purinsynthese gefordert. Die Untersuchungen an Kulturen von *Neurospora crassa* ergaben eine eindeutige Hemmwirkung von Benzbromaron sowohl auf die Purin- wie auch auf die Pyrimidinbiosynthese. Anzu-
merken wäre jedoch, daß die Hemmkonzentrationen höher sind als die unter therapeutischen Bedingungen zu erwartenden Gewebespiegel d.h. aus diesen Untersuchungen können keine Aussagen über mögliche Einflüsse einer Benzbromaron-Therapie beim Menschen getroffen werden.

Die ausgeprägtere Hemmwirkung der Pyrimidinsynthese in Kulturen von *Neurospora crassa* im Vergleich zu Kalbsfibroblasten - bei denen sie zwar signifikant, aber in ihrer Hemmwirkung nur minimal ist - wäre hervorzuheben. Im Falle des Benzbromarons bestehen weder für die bei *Neurospora crassa* zu beobachtende Hemmwirkung der Purin- noch für die der Pyrimidinbiosynthese Vorstellungen über den molekularen Wirkungsmechanismus.

6. Zusammenfassung

Allopurinol hat sich als wirkungsvolles, nebenwirkungs-freies Medikament bei der Behandlung der Hyperurikämie erwiesen. Es hemmt die Purinsynthese und auch die Pyrimidinsynthese in geringerem Ausmaß.

Vor allem durch Untersuchungen an Fibroblastenkulturen ist man zu gewissen Vorstellungen über die zu diskutierenden Wirkmechanismen gelangt. Nicht genau geklärt ist dagegen, ob Allopurinol selbst oder ein bzw. mehrere Stoffwechselmetabolite von Allopurinol die Hauptwirkung auf die Purin- bzw. Pyrimidinbiosynthese ausüben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Allopurinol, Allopurinol-1-N-Ribonucleosid und Allopurinol-1-N-Ribonucleotid sowie Oxipurinol, Oxipurinol-7-N-Ribonucleosid und Oxipurinol-7-N-Ribonucleotid auf die Purin- und Pyrimidinbiosynthese in Fibroblastenkulturen und an Kulturen von *Neurospora crassa* untersucht.

Faßt man die Ergebnisse der Kulturen von *Neurospora crassa* zusammen, so scheint es, als ob die beobachtete deutliche Hemmwirkung auf die Purin- und Pyrimidinsynthese primär am ehesten auf die Ribonucleotide von Allopurinol und Oxipurinol zurückzuführen sein dürfte.

Auch für die Hemmwirkung auf die Purin- und Pyrimidinsynthese in Fibroblastenkulturen stimmen unsere Ergebnisse

am ehesten mit der Ansicht überein, daß für den Hemmeffekt primär die Ribonucleotide von Allopurinol und Oxipurinol verantwortlich sind.

Das uricosurisch wirkende, hypourikämische Medikament Benzbromaron hemmt zumindest in unphysiologisch hohen Konzentrationen die Purin- und Pyrimidinsynthese in Kulturen von *Neurospora crassa* und in geringerem Maß zumindest unter unseren Versuchsbedingungen auch in Fibroblastenkulturen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Beardmore, T.D., Cashman, J., Kelley, W.N.:
J. Clin. Invest. 51, 1823 - 1832 (1972).
- 2 Beardmore, T.D., Kelley, W.N.:
J. Lab. Clin. Med. 78, 696 - 704 (1971).
- 3 Beardmore, T.D., Kelley, W.N.:
Clin. Res. 19, 27 (1971).
- 4 Beardmore, T.D., Kelley, W.N.:
Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 41 B.
Purine metabolism in man. Ed. by Sperling, O.,
De Vries, A., Wyngaarden, J.B.,
J.B., Plenum Press New York. London, p. 609 - 619 (1974).
- 5 Brown, G.K., Fox, R.M., O'Sullivan, W.J.:
Biochem. Pharmacol. 21, 2469 - 2477 (1972).
- 6 Elion, G.B.:
Ann. Rheum. Dis. 25, 608 - 614 (1966).
- 7 Elion, G.B., Taylor, T.J., Hitchings, G.H.:
Abstracts of Communications to the 6th International
Congress of Biochemistry, New York, p. 305 (1964).
- 8 Elion, G.B., Yü, T.F., Gutman, A.B., Hitchings, G.H.:
Amer. J. Med. 45, 69 - 77 (1968).

- 9 Feigelson, P., Davidson, J.D., Robius, R.K.:
J. Biol. Chem. 226, 993 - 1000 (1957).
- 10 Fox, R.M., Royse-Smith, D., O'Sullivan, W.J.:
Science 168, 861 - 862 (1970).
- 11 Fox, R.M., Wood, M.H., O'Sullivan, W.J.:
J. Clin. Invest. 50, 1050 - 1060 (1971).
- 12 Fyfe, J.A., Miller, R.L., Krenitsky, T.A.:
J. Biol. Chem. 248, 3801 - 3809 (1973).
- 13 Kaiser, W.:
Handbuch der Inneren Medizin Bd. VII/3
Springer-Verlag 1975 im Druck.
- 14 Kelley, W.N., Rosenbloom, F.M., Miller, J.,
Seegmiller, J.E.:
New Engl. J. Med. 278, 287 - 293 (1968).
- 15 Kelley, W.N., Beardmore, T.D.:
Science 169, 388 - 390 (1970).
- 16 Kelley, W.N., Wyngaarden, J.B.:
J. Clin. Invest. 49, 602 - 609 (1970).
- 17 Kelley, W.N., Beardmore, T.D., Fox, I.H., Meade, J.C.:
Biochem. Pharmacol. 20, 1471 - 1478 (1971).
- 18 Krenitsky, T.A., Elion, G.B., Strelitz, R.A.,
Hitchings, G.H.:
J. Biol. Chem. 242, 2675 - 2682 (1967).

- 19 Massey, V., Komai, H., Palmer, G., Elion, G.B.:
J. Biol. Chem. 245, 2837 - 2844 (1970).
- .20 Nivet, M., Marcovici, J., Larnelle, P., Farah, M.,
Bull. Mém. Soc. Méd. Hôp. Paris 116, 1187 (1965).
- 21 Rosenbloom, F.M., Henderson, J.F., Caldwell, I.C.
Kelley, W.N., Seegmiller, J.E.:
J. Biol. Chem. 243, 1166 - 1173 (1968).
- 22 Rundles, R.W., Wyngaarden, J.B., Hitchings, G.H.,
Elion, G.B., Silberman, H.R.:
Trans. Ass. Amer. Physicians 76, 126 - 140 (1963).

Lebenslauf

Edmüller Am 11. August 1942 Geburt als Sohn des
Hans-Jürgen Flugzeugführers Johann Edmüller und
dessen Ehefrau Ursula, geborene Hösel,
in Insterburg, Ostpreussen

Schulzeit

Sept. 1948 Beginn der fünfjährigen Volksschulzeit
in Allershausen, Kreis Freising
Sept. 1953 Wittelsbacher Gymnasium München
sept. 1955 Wechsel vom Gymnasium zum Natur-
wissenschaftlichen Zweig der Ober-
realschule in Weilheim i. OB
Juli 1962 Abitur an der Oberrealschule Weilheim

Bundeswehr

Okt. 1962 Beginn des zweijährigen Wehrdienstes,
der hauptsächlich in Sanitätseinheiten
erfolgte

Berufsausbildung

Okt. 1964 Praktikant der Schützenapotheke München
gemäß Approbationsordnung für Apotheker
Okt. 1966 Beginn des Pharmaziestudiums
Apr. 1970 Pharmazeutisches Staatsexamen
Okt. 1971 Approbation als Apotheker
Nov. 1970 Beginn des Medizinstudiums unter An-
rechnung von zwei Studiensemestern
Sept. 1971 Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Sept. 1972 Medizinische Vorprüfung
Dez. 1975 Medizinisches Staatsexamen

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle
Herrn Privatdozent Dr. Wolfram Kaiser
für die Überlassung des Themas und seine
fürsorgliche Betreuung aller Phasen der
Bearbeitung.

